

Aus dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G.G. Wendt

**Methodische Voruntersuchungen zur
Bestimmung des Calciumgehaltes und
morphologischer Veränderungen von
Amnion- und Carcinomzellen mit Hilfe
einer ionenselektiven Scheibenelektrode
und einer Durchströmungskammer**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

ULRIKE SCHÜTE

aus Lemgo

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg

Aus dem Institut für Humangenetik der Philipps-Universität Marburg
Direktor: Prof. Dr. med. G. G. Wendt

**Methodische Voruntersuchungen zur
Bestimmung des Calciumgehaltes und
morphologischer Veränderungen von
Amnion- und Carcinomzellen mit Hilfe
einer ionenselektiven Scheibenelektrode
und einer Durchströmungskammer**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der gesamten Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg

vorgelegt von

ULRIKE SCHÜTE

aus Lemgo

Marburg 1977

Druck: Mauersberger, Marburg



Angenommen vom Fachbereich Humanmedizin
der Philipps-Universität Marburg am 15.4.1977

gedruckt mit Genehmigung des Fachbereiches

Dekan: Prof. Dr. med. F. Neurath

Referent: Prof. Dr. med. H. Oepen

Correferent: Prof. Dr. med. W. Wesemann

INHALTSVERZEICHNIS

	Seite
1.0.0. Einleitung und Ziel der Arbeit	1
2.0.0. Materialien und Methodik	3
2.1.0. Biochemisches Instrumentarium	3
2.1.1. Elektrode	3
2.1.2. Nährlösung	12
2.2.0. Zellmaterial	12
2.2.1. Aszites-Hepatomezellen (AH 602)	12
2.2.2. Amnionzellen	14
2.3.0. Morphologisches Instrumentarium	15
2.3.1. Durchströmungskammer und Wärmeinkubator	15
2.3.2. Mikroskop und Filmkamera	16
3.0.0. Versuchsdurchführung und Ergebnisse	18
3.1.0. Durchströmungsverhältnisse in der Kammer	18
3.2.0. Morphologische Untersuchungen	25
3.2.1. AH 602-Tumorzellen	25
3.2.2. Amnionzellen	30
3.3.0. Calciummessungen mit der ionenselektiven Durchflußelektrode	32
3.3.1. Vorbereitung	35
3.3.2. Durchführung	37
3.3.3. Ergebnisse	37
3.3.3.1. AH 602 - Tumorzellen	37
3.3.3.2. Amnionzellen	37
4.0.0. Diskussion	39
4.1.0. Methode	39
4.2.0. Morphologische Befunde	39
4.3.0. Elektrochem. Befunde	40
5.0.0. Zusammenfassung	44
6.0.0. Literatur	45



Digitized by the Internet Archive
in 2026

1.0.0. Einleitung und Ziel der Arbeit

Die vitale Funktion des Calciums für den Elektrolytstoffwechsel, die Membranpermeabilität, neuronale Erregbarkeit, Muskelkontraktion und andere lebenswichtige Vorgänge ist bekannt, in Einzelheiten aber noch ungeklärt (37, 48, 14, 50, 24, 51, 10, 5, 61, 7, 63, 55).

Bei Calciumbestimmungen ist generell zu berücksichtigen, daß unter dem "Gesamt-Calcium" die Summe aus einer proteingebundenen nicht diffusiblen Fraktion und einer ultrafiltrablen Fraktion verstanden wird. Letztere unterteilt man in komplexgebundenes und ionisiertes Calcium (13, 52, 45). Die ionisierte Form wurde 1934/35 von Mc LEAN und HASTINGS (36, 57) als das eigentlich biologisch aktive Calcium beschrieben. Sie ist mit Hilfe ionenselektiver Calciumelektroden messbar.

Die Bedeutung des Calciums für Funktion und Struktur membranöser Zellorganellen ließ eine kombinierte Kontrolle ihres Verhaltens unter der Wirkung unterschiedlicher Calciumkonzentrationen des extrazellulären Milieus unter Anwendung sowohl biochemischer als auch morphologischer Kriterien wünschenswert erscheinen. Besonderes Interesse kommt dabei Entwicklungs- und Rückbildungsvorgängen zu, wie sie unter anderem bei der Untersuchung von fetalen Zellen einerseits und Carcinomzellen andererseits beobachtbar sind. Eine zuverlässige Bestimmbarkeit entsprechender Parameter setzt jedoch die Entwicklung und Sicherung einer dafür geeigneten Methodik voraus.

Im Folgenden wird über erste Versuche dieser Art berichtet, bei denen Rückbildungsphänomene von isolierten,

einer Amnionzellkultur entnommenen fetalen Zellen einerseits und Aszites-Tumorzellen (AH 602) mit Hilfe der filmischen Dokumentation morphologischer Merkmale und zeitlich koordinierter Calciumbestimmungen erfaßt wurden. Dabei wird vor allem die Anpassung der morphologischen und elektrochemischen Methodik an die Erfordernisse einer solchen Untersuchung beschrieben.

2.0.0. Materialien und Methodik

2.1.0. Biochemisches Instrumentarium

2.1.1. Elektrode

Die schon in der Einleitung erwähnte dominierende Rolle des ionisierten Calciums bei Stoffwechselprozessen und Membranfunktionen in lebenden Zellen macht die Bedeutung zuverlässiger Bestimmungen dieses Parameters deutlich.

In früheren Jahren scheiterten derartige Versuche an einer zu geringen Spezifität der Elektrode. Die heute verwendeten ionenselektiven Calcium-Durchfluß-Meßzellen (42, 36, 54, 59), bestehend aus einer Meßelektrode und einer Bezugselektrode, zeigen Calciumionen in Gegenwart anderer Ionen bevorzugt an. Allerdings muß dabei auf die Temperatur, die pH-Abhängigkeit, sowie auf Störionen geachtet werden. Eine Berechnung der Selektivitätskonstanten kann nach der Nernst'schen Gleichung erfolgen.

Nernst'sche Gleichung:

$$E = E' + 2,303 \frac{R \cdot T}{z \cdot F} (\log a_i)$$

E = Elektrodenpotential

E' = konst. Standard-Potential der Meßkette (in mV)

R = allgemeine Gaskonstante

T = absolute Temperatur

z = Ionen-Ladungen

F = Faraday-Konstante

a_i' = Ionenaktivität

Die Selektivitätsverhältnisse einer ionenselektiven Elektrode lassen sich durch Veränderung der Messionenaktivität bei konstant gehaltener Störionenaktivität (4) wiedergeben

$$\Delta E = (E'_2 - E'_1) + \frac{2,303 RT}{Z_m F} \log \frac{a_{m2} + K_{M-S} a_{s2} z_m/z_s}{a_{m1} + K_{M-S} a_{s1} z_m/z_s}$$

ΔE	= EMK-Differenz
z_m	= Ionenladung Meßion
z_s	= Ionenladung Störion
a_{m1}	= Aktivität Meßion 1
a_{m2}	= Aktivität Meßion 2
a_{s1}	= Aktivität Störion 1
a_{s2}	= Aktivität Störion 2
K_{M-S}	= Selektivitätsverhältnis Meßion (M)/Störion (S)

Beispiele für Selektivitätskonstanten nach SCHINDLER (56):
Die Ansprechbarkeit der Ca^{++} -Scheibenelektrode durch Ca^{++} -ionen im Vergleich zur Ansprechbarkeit auf andere (Stör-)ionen geht aus folgenden Beispielen für Selektivitätskonstanten hervor.

K_{Ca-H}	$6,2 \times 10^2$
K_{Ca-Na}	$9,5 \times 10^{-3}$
K_{Ca-K}	3×10^{-4}
K_{Ca-NH_4}	$3,5 \times 10^{-2}$
K_{Ca-Mg}	$1,8 \times 10^{-3}$
K_{Ca-Ca}	1

Je niedriger der Selektivitätswert desto bevorzugter wird das Meßion gegenüber dem Störion angezeigt.

Elektrodenaufbau:

Für die elektrochemischen Messungen in der Nährlösung von Yoshida-Aszites-Hepatomzellen Stamm 602 (AH 602)

und Amnionzellen wurde eine calciumselektive Durchfluß-Scheibenelektrode nach SCHINDLER und RIEMANN (54, 59) eingesetzt (Abb. 1 u. 3).

Diese Elektrode besteht aus einem ionenselektiven Kunststoff mit Stirnflächenkontakt zu einem acrylglasummantelten Platindraht (Abb. 2). Komponenten des calciumselektiven Kunststoffes sind:

Ca-Salz der Didecylphosphorsäure
Diocetylphenylphosphonat
PVC
Cyclohexanon

Die Meßkette wird mit einer Ag/AgCl-Bezugselektrode und 3 M KCL-Lösung komplettiert.

Da sich die Bezugselektrode und speziell die Stromschlüsselkontaktzone bei den Potentialmessungen als hauptsächliche Störungsquelle erwiesen hat, wurde eine neuartige mikrokapillare Kontaktzone aus einer verschweißten PTFE-Membran mit Mikroleck oder einem PTFE-Stopfen mit Mikrokerbe entwickelt (30). Die Ausflußrate für den Referenz-Elektrolyten beträgt weniger als 0,1 ml/24 h. Vorsprünge des verlängerten Acrylglasmantels der abnehmbaren Durchflußkammer mit einem Füllvolumen von ca. 3 µl und Aussparungen im Elektrodenkopf sichern die richtige räumliche Zuordnung von Durchflußkammer, Sensor und Stromschlüsselkontaktzone (Abb. 2 und 4).

Änderungen der Ca-Ionen-Aktivität (bzw. der elektromotorischen Kräfte = EMK) wurden mit einem Digital-Elektrometer (DE 751 Fresenius Apparatebau, Bad Homburg) durchgeführt. Ein an das Meßgerät angeschlossener Servogor-Kompensationsschreiber (Metrawatt AG) erleichtert die Festlegung des Meßdatenabrufes.

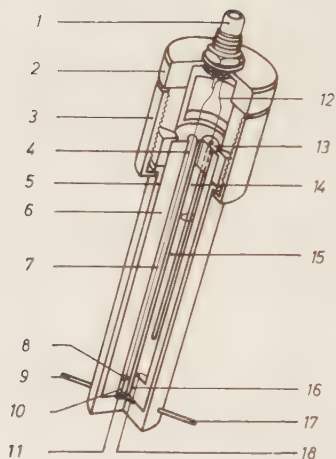


Bild 1. Scheiben-Elektrode

- 1 Amphenolstecker®
- 2 Elektrodenkopf
- 3 Überwurfmutter mit Bajonettverschluß
- 4 Durchführungskanal für versilberte, PTFE-isolierte Kupferlitze
- 5 Verlängerter Kunststoffmantel der abnehmbaren Durchflußkammer
- 6 Elektrodenkörper aus PTFE
- 7 Versilberte, PTFE-isolierte Kupferlitze
- 8 Acrylglas-Ummantelung des Platindrahtes
- 9 Meßkammerzuluß
- 10 Platindraht zur Potentialableitung vom scheibenförmigen Sensor
- 11 Scheibenförmiger Sensor
- 12 Versilberte, PTFE-isolierte Kupferlitze
- 13 Deckplatte der Bezugslösungsvorratskammer aus Acrylglas mit Durchführungen für die Bezugselektrode und den Zuleitungsschlauch für die Bezugslösung
- 14 Vorratskammer für die Bezugslösung
- 15 Bezugslösung
- 16 PTFE-Stopfen mit Mikrokerbe oder verschweißte PTFE-Membran mit Mikroleck
- 17 Meßkammerabfluß
- 18 Wannenförmige Durchflußkammer

Abb. 1: Ca^{++} -Scheiben-Elektrode für Durchflußmessungen nach SCHINDLER und RIEMANN (54)

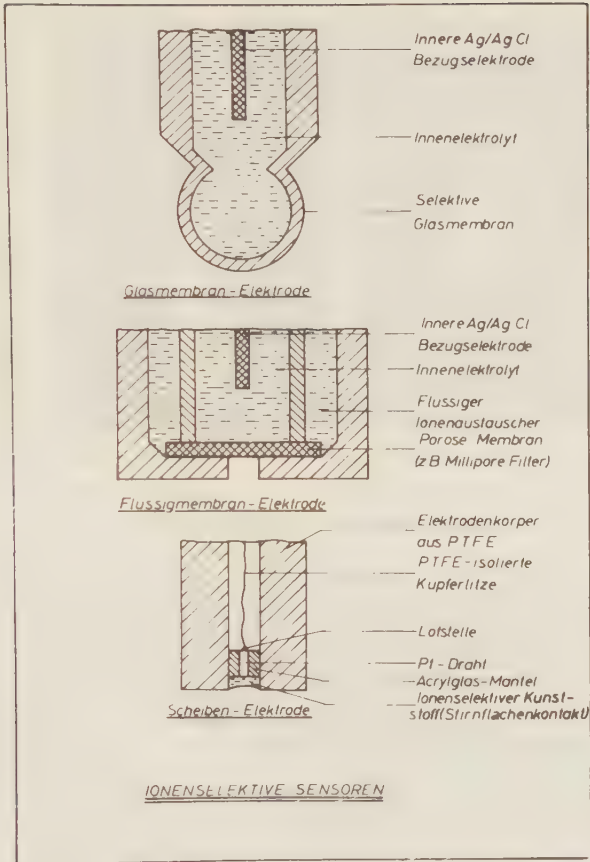


Abb. 2: Ionenselektive Sensoren nach SCHINDLER und RIEMANN (55)

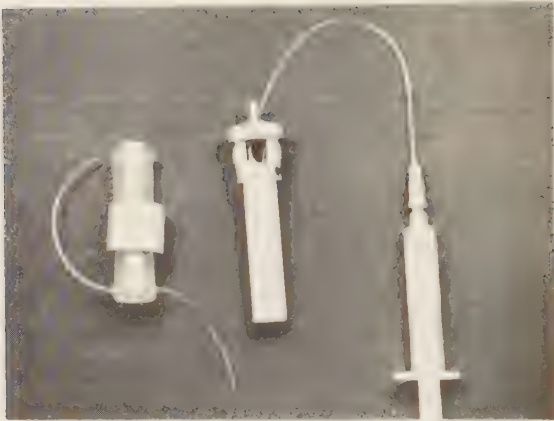


Abb. 3: Scheibenelektrode mit abgenommener Durchflußkammer (li) und Vorratskammer für Bezugslösung (Spritze re)



Abb. 4: Ionenselektives Polymer der Meßelektrode (li) und Austritt der Referenzelektrolytlösung aus dem Mikroleck (re)

Die gesamte Apparatur wurde in einem Faraday-Käfig installiert, um elektrostatische Aufladungen zu vermeiden (Abb. 5).

Elektrodeneichung:

Im Gegensatz zu Glasmembranelektroden (für die pH-Messung) wird die calciumselektive Scheiben-Elektrode trocken aufbewahrt. Vor Inbetriebnahme wird sie mit 10^{-1} M Ca Cl_2 -Lösung bis zur stabilen Meßwertanzeige vorperfundiert. Die Durchflußrate liegt im Bereich von 30 $\mu\text{l}/\text{min}$. Die Eichlösungen sind der ionalen Zusammensetzung der Meßlösungen weitgehend anzugleichen. Die Messungen wurden bei physiologischen pH-Werten und einer Temperatur von 20°C durchgeführt (Abb. 6). Mit Hilfe einer linearen Eichkurve auf semilogarithmischen Papier läßt sich die mV-Anzeige in mVal/l umrechnen. Die EMK wird als mV rel. angezeigt (Abb. 14). Zur Driftkompensation empfiehlt sich eine Zwischenkalibrierung, um eine Eichkurvenparallelverschiebung vorzunehmen. Nach unserer Erfahrung können etwa 100 Analysen nacheinander gemessen werden. Die von mir verwendete Ca^{++} -selektive Scheibenelektrode hat im Vergleich zu anderen Elektroden (36, 13) folgende Vorteile: Relativ niedrige Kosten, technisch leichte Handhabung und Einsatzbereitschaft, Robustheit, trockene Aufbewahrung und Messung minimaler Probenmengen (54).

Die für die Versuche mit AH 602 und Amnionzellen verwandten Eichlösungen E I, E II und E IV enthielten entsprechend 1, 2 und 4 mVal Calcium sowie jeweils 150 mVal Natrium, 0,9 mVal Magnesium und 4 mVal Kalium als Chlorid (s. a. Abschnitt 2.1.2.). Bei diesen Lösungen handelt es sich um ein dem Serum elektrolytmäßig entsprechendes Milieu für ein- und zweiwertige Kationen.

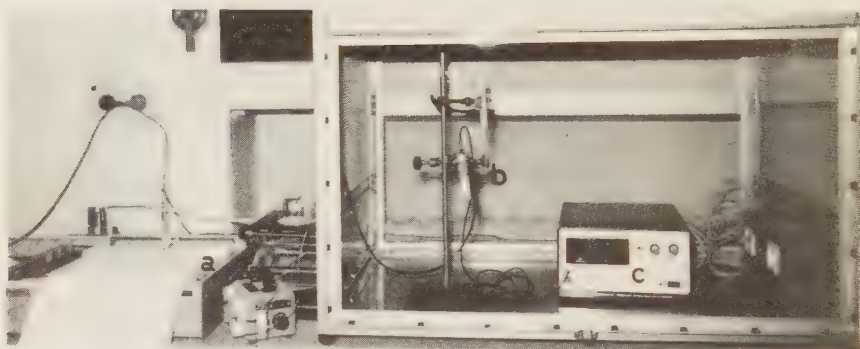
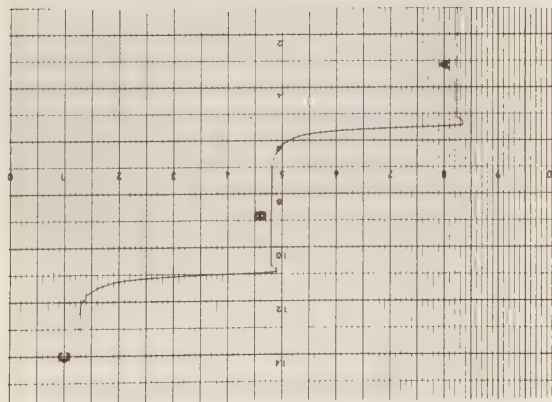


Abb. 5: Elektrodenmeßplatz im Faraday Käfig

a) Schreiber und Pumpe

b) Elektrode

c) Elektrometer



20a - Elektroden - Elektrode für Durchfließmessungen

Messung in reinen CaCl_2 - Lösungen

10^{-1} M CaCl_2	48,7 mV rel.	A
10^{-2} M CaCl_2	25,5 mV rel.	B
10^{-3} M CaCl_2	0,0 mV rel.	C

Papiertransport: 50mm/min

$T = 20^\circ\text{C}$

Durchflußrate: 50 $\mu\text{l/min}$.

Meßgerät: Digital - Elektrometer DE 751

Apparatebau Fresenius Bad Homburg

Solter Pumpe Modell 904

Abb. 6: Ausschnitt aus einer Eichkurve mit reinen CaCl_2 - Lösungen

2.1.2. Nährlösung

Die notwendige Präsenz ein- und zweiwertiger Ionen in Nährmedien wurde schon um 1900 von RINGER, LOCKE und anderen Autoren erkannt (33, 69).

Als Nährlösung wurde eine Na^+ , K^+ , Mg^{++} und Ca^{++} -Ionen enthaltende Nährlösung benutzt.

Die Einwaage enthielt:

Stammlösung (St):	Eichlösungen EI, EII, EIV
150 mval NaCl	EI = 1 mval CaCl_2 /1 St.
4 mval KCl	EII = 2 mval CaCl_2 /1 St.
0,9 mval MgCl_2	EIV = 4 mval CaCl_2 /1 St.

Die Lösungen sind den physiologischen Serumverhältnissen angepaßt. Der pH lag zwischen 7,0 und 7,4. Das ist sowohl für die Integrität der Zellen (44, 66), als auch für die Elimination der H-Ionen-Interferenzen, die sonst Ionenselektivität der Ca^{++} -selektiven Elektrode stören (12, 13, 54, 42, 4, 36).

Proteine wurden nicht zugegeben, um die Calciummessungen im Modellversuch nicht zu beeinträchtigen, da ein Konkurrenzverhalten zwischen Calciumionen und Protonen hinsichtlich der freien Valenzen an den Proteinen existiert. Die Salzlösung mit 4 mval Calciumchlorid wird im Folgenden als E IV, die mit 2 mval Calciumchlorid als E II bezeichnet. Eagles Nährmedium (Behringwerke Marburg) wird durch E symbolisiert.

2.2.0. Zellmaterial

2.2.1. Yoshida-Aszites-Hepatom Stamm 602

Wegen ihrer einfachen Handhabung bei der Züchtung wie bei der Gewinnung und Verwendung von Einzelzellen

erweisen sich Yoshida-Aszites-Hepatomzellen vom Stamm AH 602 als gut geeignet. Dieser Stamm wurde uns freundlicherweise von Herrn Doz. Dr. GERICKE (Abteilung für Krebsforschung der Firma Höchst Frankfurt / M.) überlassen. Er zeigt mehr oder weniger stark ausgeprägte Zellaggregate mit deutlich erkennbaren Einzelzellen (18, Abb. 7).

Die Yoshida-Sarkome entstanden 1943 durch Fütterung einer Ratte mit Azoverbindungen und Pinselung mit Fowlerscher Lösung auf dem Rücken des Tieres. Sie traten im Gegensatz zu anderen experimentell erzeugten Tumoren gleich in der aszitischen Form auf. Das Experiment war einmalig, denn wiederholte Versuche, denselben Tumor noch einmal zu erzeugen, blieben erfolglos (68, 1, 34, 38).

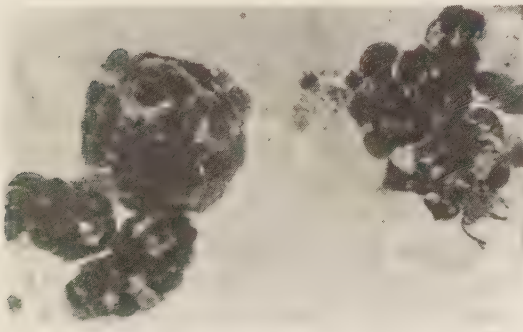


Abb. 7: Ausstrich von AH 602 (Giemsa)

Die Überimpfung des Tumors erfolgt unter sterilen Kautelen 3-4 Wochen nach Transplantation durch Entnahme von Aszitesflüssigkeit aus dem Abdomen 120-250 g schwerer männlicher Albinoratten vom Stamm Wistar AF/Han.

(bezogen vom Zentralinstitut für Versuchstierzucht in Hannover). Die so gewonnenen Zellen werden mit 0,9 % NaCl im Verhältnis 1:5 verdünnt und anschließend 0,5 ml $\hat{=}$ 5 - 700.000 Einzelzellen Wistar Albinoratten intraperitoneal injiziert (19).

2.2.0. Amnionzellen

Die Amnionzellen in gleichaltrigen Kulturen derselben Patientin wurden mir freundlicherweise von Frau TRINKAUS (Chromosomenlabor des Humangenetischen Instituts mit Poliklinik der Universität Marburg / Lahn) zur Verfügung gestellt. Die Kultur erfolgte in Amnion-Wachstums-Medium bestehend aus (62):

10 ml Minimal Eagles Medium (MEM)	10 fach konzentriert
87 ml A. bidest., pH 7,0 - 7,2	
20 ml föt. Kälberserum	
1 ml Glutamin 2,92 %-ig (384,6 mg in 20 ml A. dest.)	
1 ml Penic./Streptomycin	
0,5-1 ml NaHCO_3 10 %-ig	
1 ml Serin	(21 mg in 20 ml A. dest.)
1 ml Glycokoll	(220 mg in 20 ml A. dest.)

Die Kulturen wurden erschütterungsfrei bebrütet. Ein l. Mediumwechsel erfolgte nach 6 Tagen, danach alle 4 Tage. Die durchschnittliche Kulturdauer liegt bei 3 Wochen. Einen Tag vor den entsprechenden Versuchen wurden die Kulturen noch einmal mit frischem Medium versetzt. Die Aufarbeitung geschah nach folgendem Schema:

- 1) Kulturmedium aus der Flasche abgießen
- 2) mit Trypsin STV Lösung (Versen-Trypsin von den Behringwerken Marburg / Lahn) ausschwenken

- 3) mit Trypsin bei 37° C 5-10 min inkubieren, schwenken und falls erforderlich mit Pasteur-Pipette suspendieren
- 4) 10 min bei 1000 U/min zentrifugieren
- 5) Überstand abgießen
- 6) Nährmedium zugeben
- 7) Zellzählung in der Fuchs-Rosenthal-Kammer

2.3.0. Morphologisches Instrumentarium

2.3.1. Durchströmungskammer und Wärmeinkubator

Um morphologische Untersuchungen an Einzelzellen ausführen zu können, wurde eine Durchströmungskammer (nach HEUNERT) benutzt (Abb. 8).

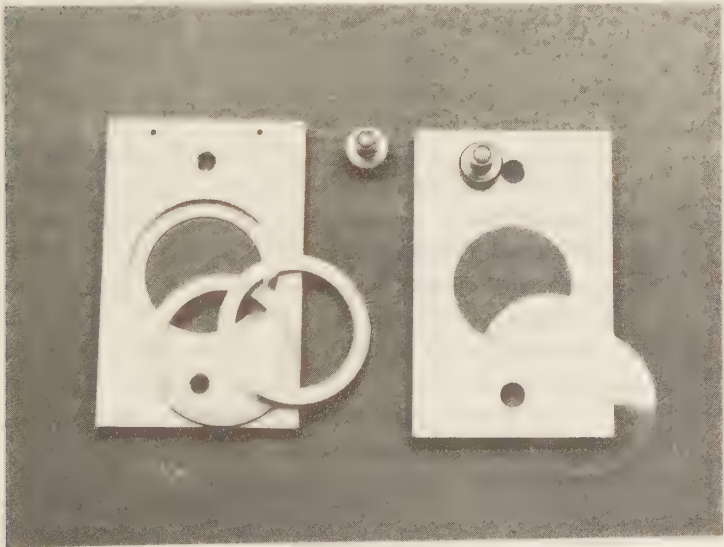


Abb. 8: Durchströmungskammer zerlegt (s. Text)

Sie hat einen äußeren Umfang von 4,5 x 7,0 cm und einen inneren Durchmesser von 3,2 cm. Zwei Stahlgehäuseanteile werden durch Schrauben zusammengehalten, zwischen denen zwei Deckgläser (Dicke 0,17 mm, Ø 32 mm), durch Gummiringe gepolstert, einen Inhalt von 1 ml begrenzen. 17er-Einmal-Kanülen als Zu- bzw. Abflüsse regulieren den Durchstrom.

Um die Zellen in der Durchströmungskammer auf einer Temperatur von 37° C zu halten, wurde ein Warmluftinkubator nach DVORAK und STOTLER benutzt. Uns stand das Modell ASI-400 (Nicholson Precision Instruments Inc. Bethesda, Md., USA) zur Verfügung. Es arbeitet unabhängig von der Umgebungstemperatur mit einem Thermosensor und einem Doppelthyristor, der auf leichteste Temperaturschwankungen sofort anspricht und die gewählte Temperatur auf $\pm 0,1^{\circ}$ C konstant hält (35, 39).

2.3.2. Mikroskop und Kamera

Das zu untersuchende Material wurde nach Eingabe in die Durchströmungskammer mit dem Leitz-Diavert-Mikroskop beobachtet. Da die Untersuchungen an vitalen und ungefärbten Einzelzellen erfolgen sollen, wurde die Interferenzkontrasteinrichtung nach NOMARSKI verwendet. Sie erweist sich auf Grund der Morphologie der zu beobachtenden Zellen und der Versuchsmethodik als geeignet (64, 33, 61, 9, 11, 8, 22, 60, 29, 28, 27, 69). Die Beleuchtung erfolgte durch eine 100 W 12 V Halogen-Glühlampe im "Lampenhause 100".

Zur mikrokinematographischen Dokumentation wurde eine umgebaute 16 mm Filmkamera Bolex H 16 EL benutzt (64). Die Aufnahmen erfolgten auf Kodak Eastmann-4-x-SW-

Negativ-Film; die Bilder wurden auf Ilford-Photographic-Paper-Gradation-2 abgezogen. Entsprechende Ilford-Chemikalien dienten zur Entwicklung und Fixation.

3.0.0. Versuchsdurchführung und Ergebnisse

3.1.0. Durchströmungsverhältnisse in der Kammer

Die zur Verfügung stehende Durchströmungskammer nach HEUNERT (Abb. 8) besitzt insgesamt vier Bohrungen als Ab- und Zuflüsse. Es liegt nahe, zunächst einmal die Durchströmungsverhältnisse bei unterschiedlichen Ein- und Ausgangskombinationen (Abb. 9) zu untersuchen. Wir haben eine solche Untersuchung durchgeführt. Dabei erfolgten die Messungen im Anreicherungs- und Verdünnungsverfahren mit Methylenblau (1/1000) verdünnt, das in den ersten 5 min sowohl in wässrigen als auch in serumartigen Medien der Durchströmung in die vorgefüllte Kammer (ohne Zellen) gegeben wurde. Gemessen wurde im 5 Minutenabständen, um messbare Mengen für die Extinktion zu erhalten. Die Berechnung der Konzentration von Methylenblau aus dem gemessenen Extinktionswert erfolgte nach der Formel:

$$E = d_e \cdot c$$

$$c = E/d_e$$

$$E = \text{Extinktion}$$

$$d = \text{Dicke der Küvette}$$

$$c = \text{Konzentration}$$

$$e = \text{Extinktionskoeffizient}$$

Damit läßt sich die Konzentration wie folgt berechnen:

$$c = \frac{c_{\text{Eich}}}{E_{\text{Eich}}} E_{\text{gemessen}}$$

Die Trübung und Klärung des Kammerinhalts wurde in entsprechenden Zeitabständen sowohl photographisch dokumentiert als auch an den Extinktionsänderungen gemessen. Dazu wurde ein Eppendorf-Photometer 1100 M (Netheler & Hinz GmbH, Hamburg) bei Hg 578 verwendet. Zu- und

Varianten des Zu- und Abflusses einer Durchströmungs-
kammer mit 4 Bohrungen

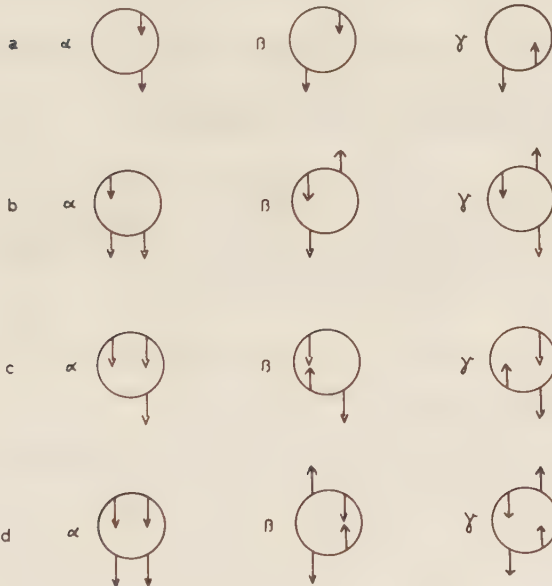


Abb. 9: a) 1 Zufluß und 1 Abfluß
b) 1 Zufluß und 2 Abflüsse
c) 2 Zuflüsse und 1 Abfluß
d) 2 Zuflüsse und 2 Abflüsse

Abflüsse wurden mit modifizierten Infusionssystemen geregelt; die Durchflußgeschwindigkeit wurde durch die Höhe der Flüssigkeitssäule reguliert (nachfolgende Angaben für einen Bereich von 19 cm Höhenunterschied von der Flüssigkeitssäule zum Kammerabtropfpunkt). Die Problematik der Durchströmungsverhältnisse kann zusammenfassend auf zwei Grundprobleme reduziert werden:

- 1) Wie können den Zellen möglichst schnell und gleichmäßig in optimaler Weise frisches Nährmedium und andere Substanzen zugeführt werden ?
- 2) Wie können verbrauchtes Nährmedium und darin enthaltene Zellabbaustoffe und andere Substanzen möglichst schnell und gleichmäßig aus der Umgebung der Zellen weggeschafft werden ?

Die Ergebnisse lassen sich folgendermaßen zusammenfassen:

A) Wässriges Medium:

- 1) Eine gleichmäßige und intensive Kammerverteilung von Methylenblau läßt sich (nicht) nachweisen in wässrigem Medium:
 - a) α nach 3 min
 β nach 3 min
 γ nicht möglich
 - b) α nach 3 min
 β nach 5 min
 γ nach 5 min
 - c) α nicht möglich
 β nicht möglich
 γ nicht möglich

- d) α nicht möglich
- β nicht möglich
- γ nicht möglich

2) Photometrisch (Abb. 10 u. 11) ergibt sich:

- a) für α , β und γ : Extinktionsmaxima ($\beta > \alpha > \gamma$)
nach 10 min; danach kontinuierlicher Abfall;
nach 25-30 min nähern sich die Extinktionskurven asymptotisch der Zeitachse,
- b) für α : Extinktionsmaximum ($\alpha > \beta$) nach 10 min;
danach Abfall mit asymptotischer Näherung an die Zeitkurve zwischen 35-40 min.
für β : Maximum erst nach 15 min mit asymptotischer Näherung an die Zeitachse.
für γ : Extinktionsmaximum nur ca. die Hälfte von α und β bei 15 min mit Näherung an die Zeitachse nach 20-25 min (wie α)
- c) für α , β und γ : Extinktionsmaxima ($\alpha > \beta > \gamma$) bei 10 min mit asymptotischer Annäherung an die Zeitachse zwischen 20-25 min.
- d) für α und β : Extinktionsmaximum ($\alpha > \beta$) nach 10 min und einer asymptotischen Annäherung an die Zeitachse zwischen 20-25 min.
für γ : Extinktionsmaximum bei 15 min (Höhe ca. $1/3$ von α und β) und Annäherung an die Zeitachse nach 35-40 min.

B) Serumartiges Medium:

In serumartigem Nährmedium liegen die Durchströmungsverhältnisse insgesamt etwas günstiger, sowohl in Bezug auf eine gleichmäßigere Zu- und Abfuhr als auch

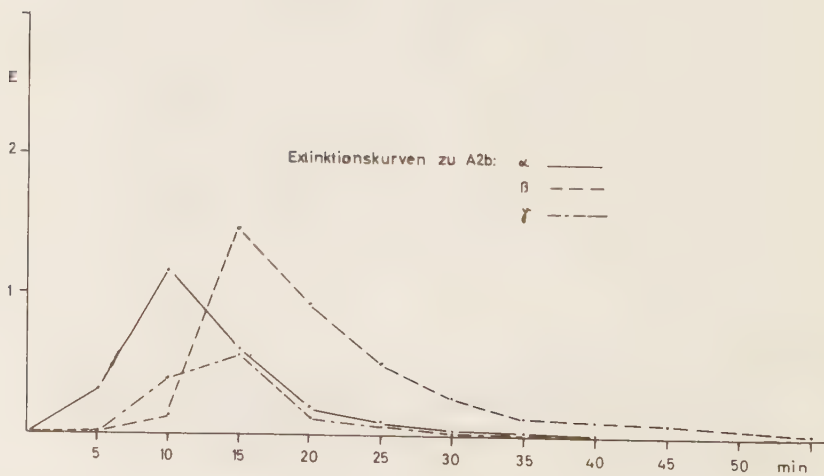
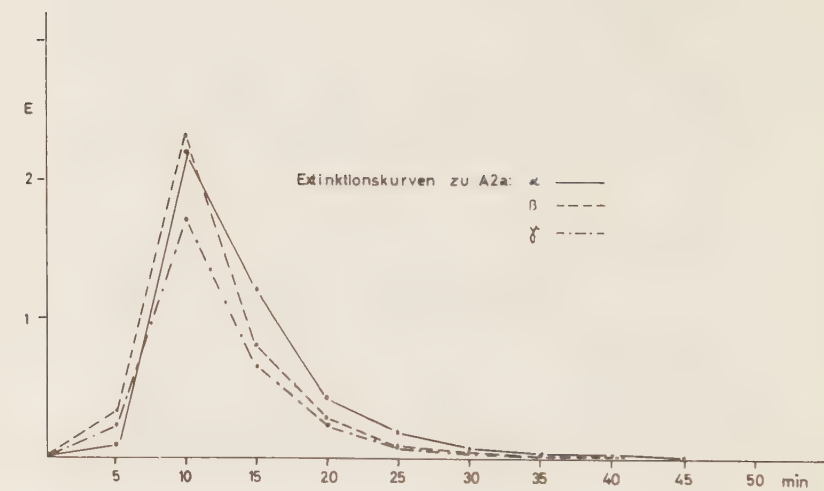


Abb. 10: Extinktionen in wässrigem Medium für a) u. b)

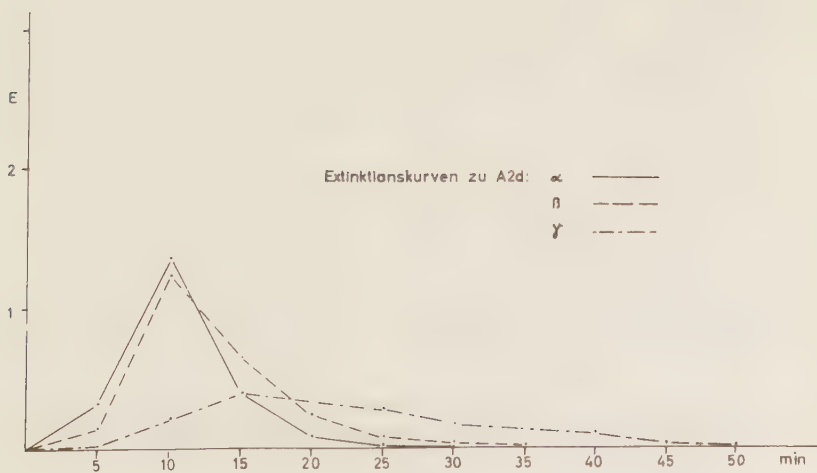
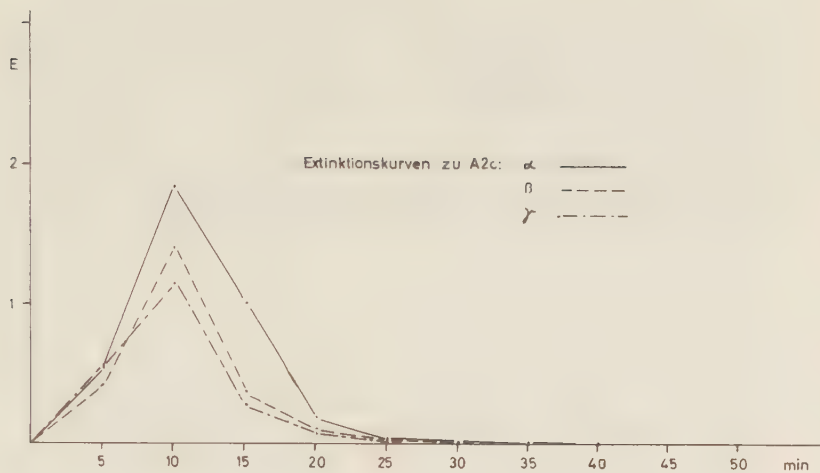


Abb. 11: Extinktionskurven in wässrigem Medium für c) u. d)

in Bezug auf die Konzentration der Flüssigkeiten. Auf eine ausführliche Beschreibung der photographischen und photometrischen Ergebnisse kann an dieser Stelle verzichtet werden, da die weiteren Versuche nur in wässrigem Medium erfolgten.

Die Durchflußgeschwindigkeiten hängen in jedem Fall neben dem Druck der Flüssigkeitssäule auch von der Anzahl und Lage der benutzten Zu- bzw. Abgänge ab (Abb. 12).

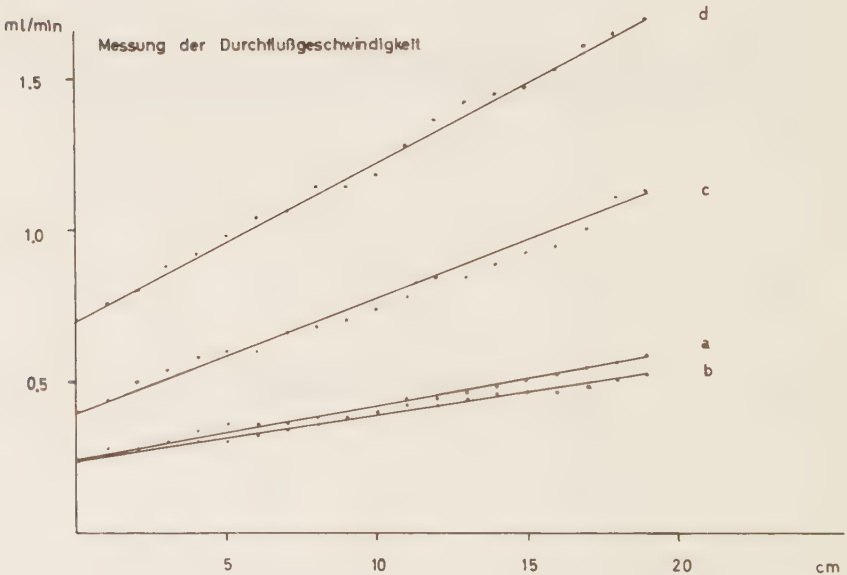


Abb. 12: Kammerdurchflußgeschwindigkeiten (Mittelwerte)

3.2.0. Morphologische Untersuchungen an AH 602-Tumorzellen und an Amnionzellen.

Die recht komplexen Zusammenhänge der Durchströmungsverhältnisse in der Kammer ließen es ratsam erscheinen, die Beobachtungs-Kammer bei den morphologischen Untersuchungen zunächst nicht im Perfusionssystem zu benutzen. Dadurch konnten eindeutige, einfache und reproduzierbare Bedingungen für den gewählten Modellversuch beibehalten werden.

3.2.1. AH 602

3 - 4 Wochen nach Tumortransplantation wurde den Ratten Aszitesflüssigkeit entnommen (s. a. Abschnitt 2.2.0) und davon ca. 1,25 Millionen Zellen/ml Nährmedium in die Beobachtungskammer gegeben. Die Temperatur wurde auf 37° C gehalten. Ausführliche Untersuchungen von VOLLMER (64) am hiesigen Institut mit AH 130 Zellen in Eagles Nährmedium (= E) ergaben, daß die entsprechende Anzahl an Einzelzellen in der benutzten "stationären" Durchströmungskammer mindestens über einen Zeitraum von 90 min intakt bleiben und keine Zeichen einer Zellveränderung bzw. -Schädigung erkennen lassen. Meine Beobachtungen mit AH 602 in E verliefen analog. Weitere intensive Untersuchungen in E II und E IV erfolgten mit Hilfe der Mikrokinematographie unter gleichzeitiger visueller lichtmikroskopischer Kontrollbeobachtung (s. a. Abschnitt 2.3.2.). Die Aufnahmen erfolgten im 1 min-Rhythmus über ein Intervall von 120 min, danach 1 h-Rhythmus bis zu 16 h nach Zelleingabe in die Kammer.

Bei der Beurteilung der Zellveränderungen wurde von einem "Normalzelltyp" ausgegangen, der folgendes Bild bietet: Die Zelloberfläche ist glatt und gleichmäßig abgerundet und zeigt keine oder nur sehr wenige

Bildtafel I

— 10 μ



AH 602 nach 60 min in E II



AH 602 nach 60 min in E IV



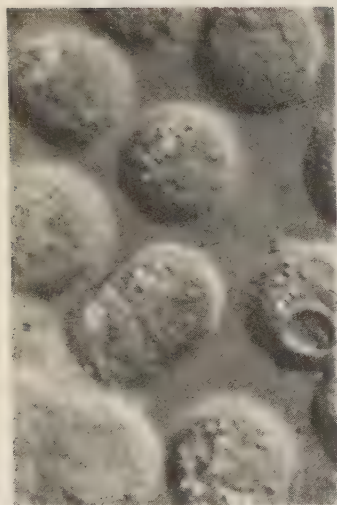
AH 602 nach 75 min in E II



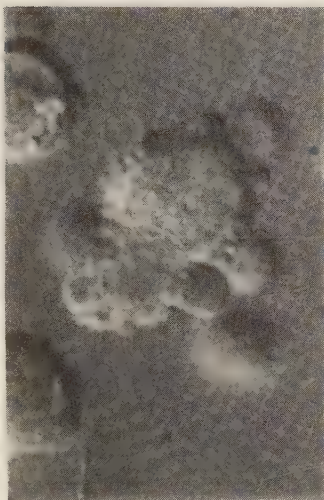
AH 602 nach 75 min in E IV

Bildtafel II

————— 10 μ



AH 602 nach 90 min in E II



AH 602 nach 90 min in E IV

Bildtafel III

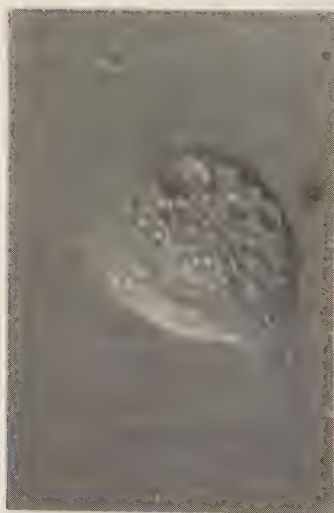
— 10 μ



Amnionzelle - "Grundzelltyp"



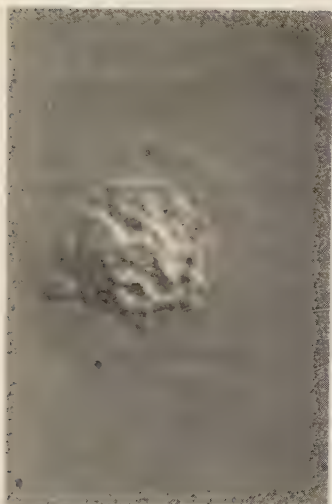
Amnionzelle 18 min in E II



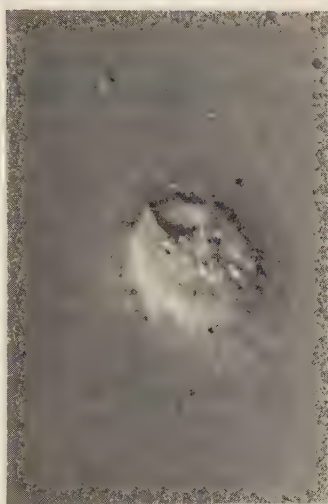
Amnionzelle 15 min in E IV

Bildtafel IV

→ 10 μ



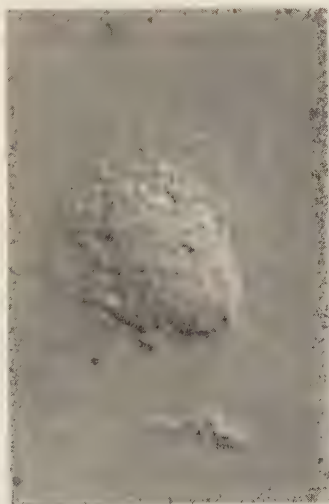
Amnionzelle 65 min in E II



Amnionzelle 55 min in E IV



Amnionzelle 60 min in E



Amnionzelle 75 min in E

"spritzerartige" Vesikel. Feinste fadenförmige Fortsätze strahlen von der Oberfläche in unregelmäßiger Weise aus. Bei diesem Aussehen durfte eine intakte, nicht geschädigte Zelle erwartet werden (25, 58). Damit liegen einheitliche und reproduzierbare Voraussetzungen für morphologische Vergleichsbeobachtungen vor (Bildtafeln I und II).

In E II:

Die Zellen erschienen bis zu 75 min relativ unverändert. Im weiteren Verlauf bis zu 3 h zeigen sich diskrete Randunschärfen bzw. vermehrte Unregelmäßigkeiten an der Zelloberfläche; danach häuft sich eine fortschreitende Vesikelbildung mit Abschnürungen und "kraterförmiger" Zelloberflächenbeschaffenheit.

In E IV:

Deutliche Randunschärfen und eine Tendenz zur Entstehung von Unregelmäßigkeiten an der Zelloberfläche werden schon nach 60 min sichtbar. Im weiteren Verlauf erfolgt eine massive grobblasige Vesikelbildung mit Abschnürung und Ausstoßung der entstandenen Blasen. Die Zellform wird plump. Der Plasmafluß ist intensiver als bei E II.

3.2.2. Amnionzellen:

Nach Einbringen von ca. 1,25-1,30 Millionen Zellen (s. a. Abschnitt 2.2.2.) in die Beobachtungskammer wurden die Zellen in verschiedenen Nährmedien bei 37° C über einen Zeitraum von 80 min morphologisch untersucht. Die Filmaufnahmen erfolgten in 1 min-Abstand. Auch hierbei wurde wegen der Vergleichbarkeit von einem "Grundzelltyp" ausgegangen, für den folgende Kriterien charakteristisch sind (26):

Die Zelle ist kugelrund mit nur leichten Vertiefungen und vesikelartigen Erhöhungen der Oberfläche; der Rand zeigt keine Unschärfen (s. Bildtafeln III u. IV).

In E:

Nach 30 min verformt sich die anfangs runde Zelle leicht länglich; im weiteren Verlauf wird der Rand unschärfer mit vermehrter Vesikelbildung und Abschnürung kleiner Bläschen. Die Zelle scheint sich leicht zu vergrößern.

In E II:

Die Zelle verflacht sich zu einem "Pfannkuchen" und vergrößert sich dabei innerhalb der ersten 20 min auf das Doppelte bis Dreifache der Ausgangszelle unter intensiver und grober diffuser Vesikelbildung. Danach nähert sie sich wieder mehr der ursprünglichen Rundform und scheint dabei zu schrumpfen.

Grobe Bläschen werden abgeschnürt. Der Plasmafluß besonders in den "kraterförmigen" Gebilden ist auffällig heftig.

In E IV:

Die morphologischen Veränderungen sind die gleichen wie bei Verwendung von E II; allerdings treten sie bei E IV ca. 5 - 10 min früher auf. Auffällig ist, daß in der beobachteten Zelle nur eine riesige Vakuole entsteht - und erhalten bleibt.

Die Beobachtungen bei AH 602 und Amnionzellen lassen folgende Schlüsse zu: Auch in der nichtdurchströmten Kammer kann eine bestimmte Zellzahl über einen begrenzten Zeitraum unverändert gehalten werden. Dabei scheint E für beide Zellarten ein optimaleres Medium als E II zu sein. E IV ist von den drei verwandten Nährlösungen für beide Zellarten am "unphysiologischsten", wenn

man die beschriebenen morphologischen Veränderungen als Ausdruck einer veränderten Stoffwechsellaage, Abwehrfunktion oder allgemeinen Zellschädigung deutet (25, 30, 32, 31, 58, 16). Dabei zeigt sich, daß Amnionzellen empfindlicher reagieren als AH 602-Tumorzellen. Allerdings muß der Einfluß des Zentrifugierens und des Trypsins diskutiert werden (21, 2). Abschließend kann man feststellen, daß "unphysiologisch" hohe Werte von 4 mVal ionisiertem Calcium/l Nährmedium morphologische Zellveränderungen hervorrufen.

3.3.0. Calciummessungen mit der ionenselektiven Durchfluß-elektrode

Bei den folgenden Experimenten mit Zellsuspensionen der AH 602- und Amnionzellen sollte der Einfluß auf deren Metabolismus bei Inkubation in einer Lösung mit höherer Konzentration der biologisch aktiven Calciumionen mit der calciumselektiven Elektrode untersucht werden.

3.3.1. Vorbereitung

Vor Versuchsbeginn muß die Elektrode zur Kontrolle mit 10^{-1} CaCl_2 -Lösungen vorperfundiert werden. Dann erfolgt die Kalibrierung mit E II und E IV bis eine stabile reproduzierbare Elektrodensteilheit von $\Delta E = E_{IV} - E_{II}$: 7 - 8 m Volt an dem Digitalelektrometer angezeigt und graphisch auf den Kompensationsschreiber bei einer Laufgeschwindigkeit von 30 mm/min und 50 mV Empfindlichkeit dargestellt wird (Abb. 13).

Mit Hilfe der Eichkurve kann die Elektrodenfunktion leicht und anschaulich überprüft werden. Auf dem semilogarithmischen Papier wird auf der Ordinate die gemessene EMK-Anzeige (in m Volt) und auf der Abzisse semilogarithmisch die Ionenaktivität (Abb. 14) (m Val) aufgetragen (4).

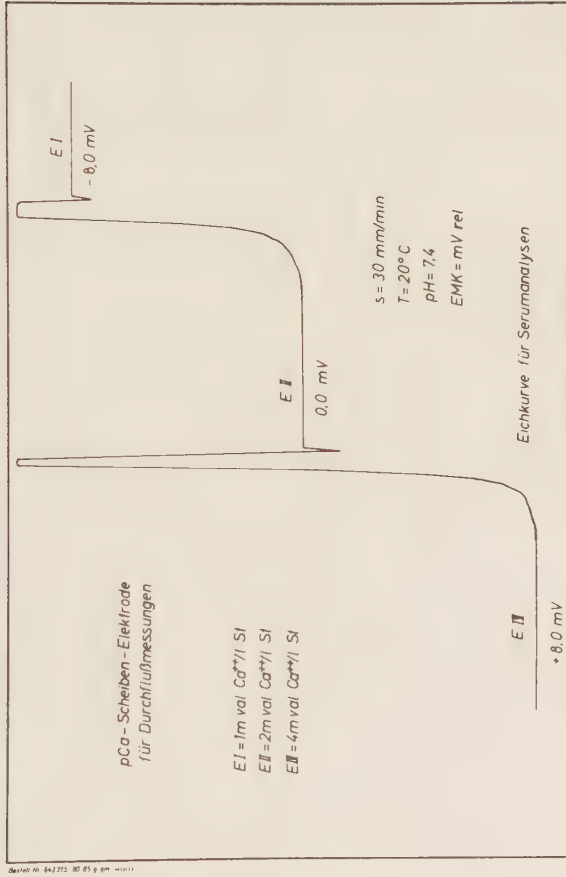


Abb. 13: Eichkurve zur Bestimmung der Elektrodensteilheit

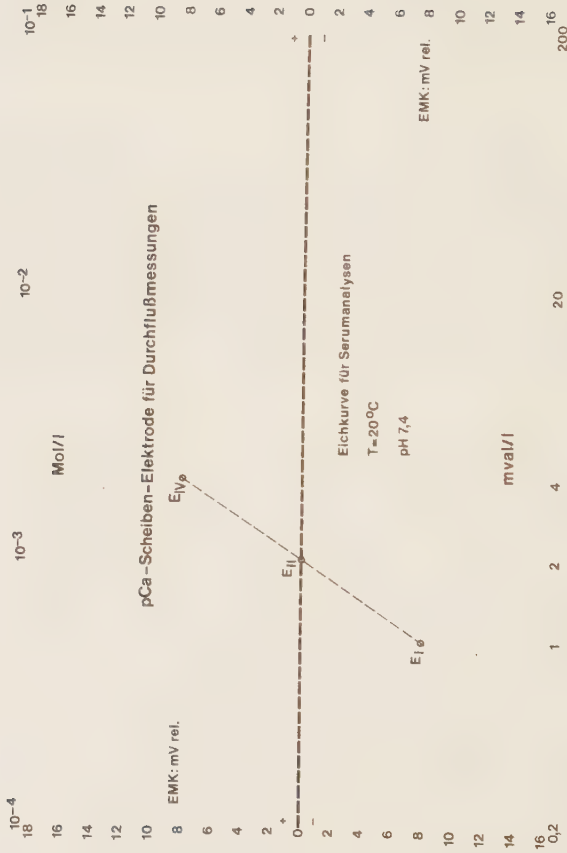


Abb. 14: Eichkurve der Elektrode

3.3.2. Durchführung

Nach "Transplantationsreife" der AH 602-Tumorzellen d.h. zwischen 3 - 4 Wochen nach Überimpfung, wird der lebenden männlichen Wistarratte mit einer 17er-E-Kanüle unter sterilen Kautelen durch die Faszienloge des Oberschenkels aus dem Peritonealraum Aszitesflüssigkeit entzogen. In einem Glaszylinder wird sie mit E IV (unphysiologisch hohe Konzentration von 4mVal ionisiertem Calcium) aufgefüllt, so daß eine Zellsuspension von ca. 1,25-1,30 Millionen Zellen/ml Inkubationsflüssigkeit entsteht. Die Amnionzellen werden wie in 2.2.2. beschrieben gewonnen und analog behandelt.

Bei 37°C wird die Analysenlösung im Wasserbad (Köttermann Modell 3047) bewegt, so daß eine regelmäßige Durchmischung der Zellen mit der Inkubationslösung erreicht wird (68). Anschließend werden in bestimmten Zeitabständen (s.u.) mit einer Eppendorf-Pipette je $200\text{ }\mu\text{l}$ = $0,2\text{ ml}$ zellfreie Flüssigkeit entnommen und in ein Reaktionsgefäß 3810 Eppendorf 2000 gefüllt. Die Calciumbestimmung der Proben bei Raumtemperatur (20°C) erfolgt nach vorherigem Schütteln, um die Entstehung eines Calciumgradienten im Gefäß auszuschalten (41). Um eine kontinuierliche Durchflußrate durch die Elektrode zu gewährleisten (4 ml/h), werden die Analysen durch ein Schlauchsystem (PVC Nr. 1 und 2) mit Hilfe einer Roller-Pumpe Serie 900 (Firma Extracorporeal Medical Specialities Inc. USA) gesaugt. Die gemessenen Proben werden anschließend verworfen. Für Kontrollmessungen wurden Proben 12 h im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt; die Messwerte entsprachen einander (13).

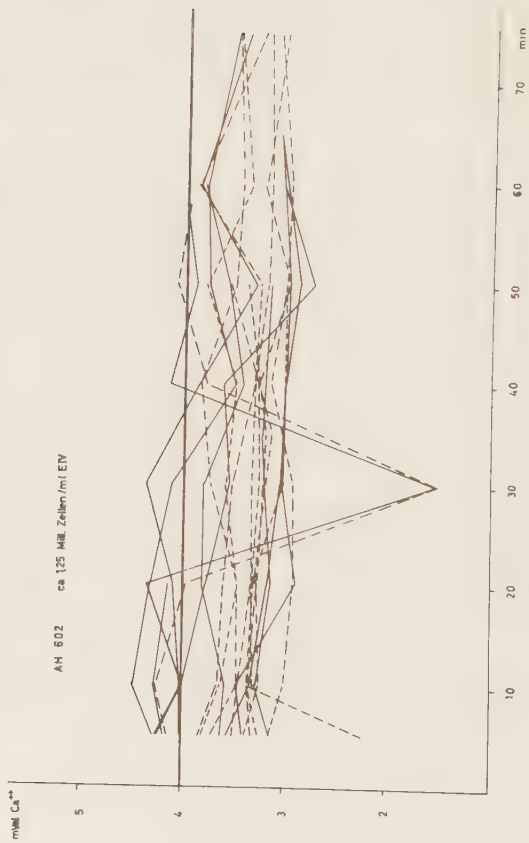


Abb. 15: Calciummessungen bei AH 602

3.3.3. Ergebnisse

3.3.3.1. AH 602 - Tumorzellen

Insgesamt wurden mit den Zellen des AH 602 an 7 Tieren 19 Versuche mit durchschnittlich 9 Einzelmessungen durchgeführt. Aus technischen Gründen konnte der erste Calciumwert erst nach 5 min gemessen werden, gefolgt von Bestimmungen nach 10, 20, 30, 40, 50, 60, 75, 95, 115 und 135 min.

Die einzelnen Diagramme zeigen keine einheitliche Tendenz (67). Man erkennt sowohl Anstiege als auch Abfälle des ionisierten Calciums im Verlauf bis 60 min; danach folgt eine Annäherung, im weiteren Verlauf bis 135 min eine Angleichung der gemessenen Calciumwerte unterhalb von E IV (Abb. 15).

3.3.3.2. Amnionzellen

Von 100 Einzelmessungen an Amnionzellen erfolgten 70 Bestimmungen mit 1,38 Millionen Zellen und 30 Bestimmungen mit ca. der doppelten Zellzahl = 2,5 Millionen Zellen/ml Inkubationsflüssigkeit. Bei sämtlichen Messungen sank der Gehalt an Calcium schon nach 5 min auf etwa die Hälfte und blieb danach im Wesentlichen konstant. Eine Verstärkung des Calciumabfalls zeigte sich mit Erhöhung der Zellzahl (Abb. 16).

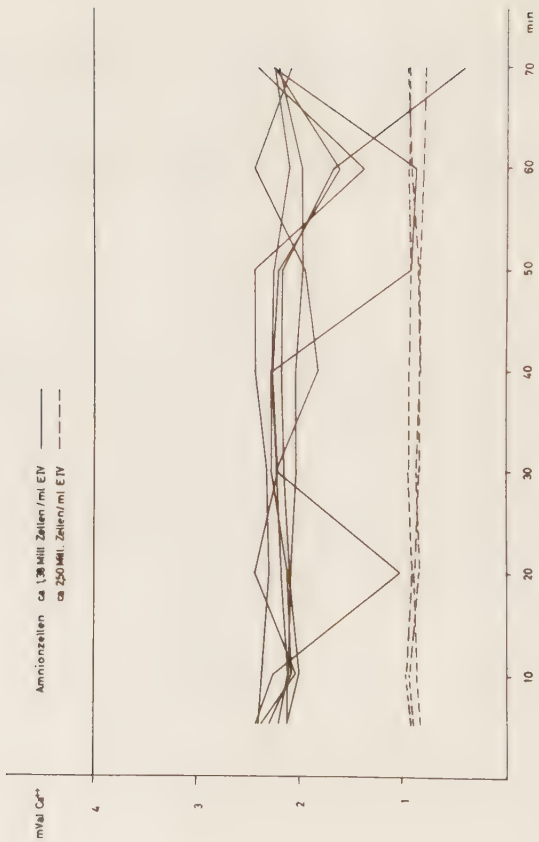


Abb. 16: Calciummessungen bei Amnionzellen

4.0.0. Diskussion

4.1.0. Methode

Voraussetzung für das Gelingen der Methode ist ein genaues Einhalten der im Abschnitt Methodik (s. Abschnitt 2.0.0.) beschriebenen Verfahrensweisen. Bei den biochemischen Instrumentarien muß die äußerst empfindliche Meßwertanzeige des Digital-Elektrometers erwähnt werden, das den im Umgang mit Elektrodenmessungen Ungeübten leicht zu Fehleinschätzungen der Meßwertanzeige (mV) veranlaßt. Ein konstant bleibender mV-Wert über 20-30 Sekunden kann verwertet werden.

Die geringen laufenden Kosten und die kurze Vorbereitungszeit der Elektrode von maximal 1 Stunde (Vorperfundieren, Durchfluß der Eichlösungen) eröffnet die Möglichkeit mehrere Elektroden gleichzeitig zu bedienen; dadurch könnte die Methode auch für den Routinebetrieb interessant sein.

Um Uneinheitlichkeiten im Zellzyklus auszuschalten, wäre es für weitere Untersuchungen zu erwägen, mit synchronisierten Zellen zu arbeiten.

4.2.0. Morphologische Befunde

Die Aszites-Hepatomezellen (AH 602) und Amnionzellen zeigen in verschiedenen Nährmedien Veränderungen (Randunschärfe, Krater und Vesikelbildung) in Abhängigkeit vom Calciumgehalt und der Inkubationsdauer im Nährmedium. Bei Langzeitbeobachtungen konnten diese Veränderungen als irreversible Schädigung gedeutet werden (23). Außerdem zeigen die beiden verschiedenen Zelltypen auch unterschiedliche morphologische Veränderungen.

Die Amnionzellen reagieren auf erhöhten Calciumgehalt der Extrazellulärflüssigkeit etwa 1 Stunde früher als die AH 602-Zellen (in E II nach 20 min, in E IV nach 10 min). Morphologisch kommt es innerhalb dieses Zeitraumes zu einer Vergrößerung des Zelleibes auf das zwei- bis dreifache und zu anschließender Schrumpfung mit Bildung von Vakuolen und deren Extrusion. Diese Vorgänge sind in E II nach 65 min, in E IV nach 55 min deutlich ausgeprägt. E II stellt für die Amnionzellen kein so günstiges Milieu dar wie für die AH 602 Zellen. Dabei muß an eine Vorschädigung der Membran und weiterer Zellorganellen gedacht werden, die eventuell auf die Trypsinierung und Zentrifugation zurückzuführen sind (21, 2, 13).

In E II kam es zu diffuser, in E IV solitärer Vakuolenbildung. Die Filmdokumentation beweist, daß ein und dieselbe Zelle sich über eine bestimmte Zeitspanne hinweg gleich verhält (Bildtafel III und IV). Verfolgt man die Veränderungen der AH 602-Zellen über einen Zeitraum von 16 h, so sind prägnante Verformungen und Auflösungserscheinungen mit Plasmaausstülpungen in E IV schon bei 90 Minuten sichtbar (Bildtafel I und II). Die von VOLLMER (64) untersuchten AH 130-Zellen zeigen diese Veränderungen bereits zu einem früheren Zeitpunkt. Sie dürfen als Ausdruck des "Zelltodes" angesehen werden (31, 58).

4.3.0. Elektrochemische Befunde

Der Einwand, daß morphologisch eine Zelle verfolgt wurde, elektrochemisch aber das Verhalten vieler Zellen verfolgt wurde, trifft zu. Er wird aber weitgehend relativiert durch die Tatsache, daß die für die morphologische Untersuchung ausgewählte Einzelzelle repräsentativ der Verfassung der Mehrzahl aller Zellen in

diesem Stadium entsprach. Die Messung des ionisierten Calciums der Nährlösung spiegelt nicht nur extra- und intrazelluläre Ionenverschiebungen wider, sondern könnte auch eine den morphologischen Prozessen entsprechende Änderung des Proteingehaltes und damit der Proteinbindung der Ca^{++} -Ionen reflektieren. Auf eine Zugabe von Proteinen in die Eichflüssigkeiten wurde gerade wegen ihrer Calciumbindungskapazität zunächst verzichtet (2, 57). Ein entsprechender Störeffekt der Trypsinierung zur Isolation der Einzelzellen läßt sich allerdings nicht ganz ausschließen.

Die Calciummessungen an AH 602 zeigen für die Dauer einer Stunde keine einheitliche Tendenz. Gemäß der graphischen Darstellung in Abb. 16 liegen die Calciumwerte sowohl ober- als auch unterhalb der 4 mval CaCl_2/l . Dann erfolgt bis 135 Minuten eine Angleichung der Kurven unterhalb von 4 mval. Nach 30 Minuten zeigen 2 Verlaufskurven der Calciumwerte (= zwei Zellsuspensionen, die vom selben Versuchstier gewonnen wurden) stark abfallende Tendenz. Da der Versuch im Gegensatz zu den übrigen Messungen nachts durchgeführt wurde, muß neben einer individuellen Spezifität des Wirtstieres auch eine tageszeitliche Abhängigkeit des Stoffwechsels und der Zellteilung in Betracht gezogen werden.

Ebenfalls sind eventuelle zellspezifische Teilungsgeschwindigkeiten zu berücksichtigen. Untersuchungen von VOLLMER (64) mit AH 130 und Beschreibungen anderer Autoren (17, 15, 20) lassen eine Beziehung des Befundes mit unterschiedlichen Phasen des Zellzyklus ebenfalls möglich erscheinen.

Abb. 16, 17 zeigt, daß die Relation zwischen Zellzahl und Calciumwert von der ersten Messung bis zur 70. Min gleich bleibt. Wäre eine mit zunehmender Versuchsdauer abfallende Calciumaktivität nachzuweisen, könnte es sich um den Ausdruck zunehmender Calciumbindung aus den

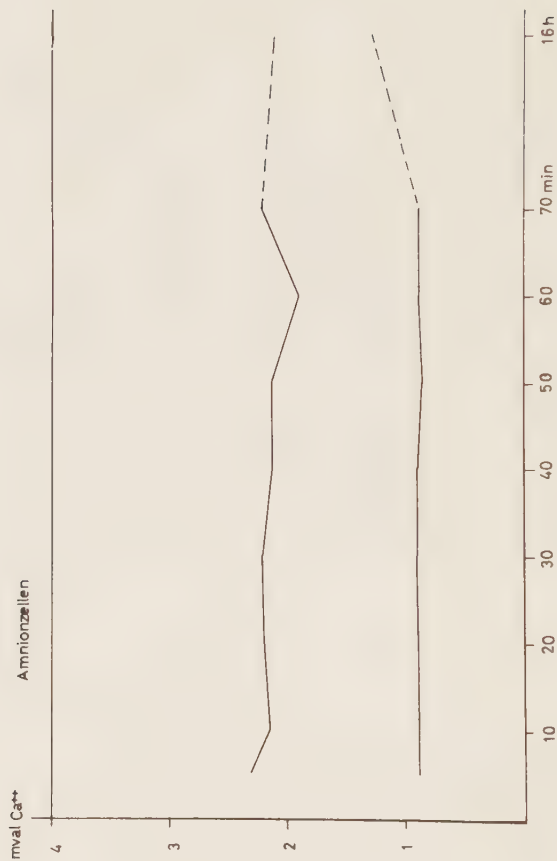


Abb. 17: Calciummessungen bei Amnionzellen - arithmetische Mittelwerte

(zunehmend geschädigten) Zellen - weniger wohl um eine steigende Calciumresorption in die Zellen - handeln. So aber könnte der gleichbleibende Kurvenverlauf darauf deuten, daß die suspendierten Zellen noch 70 min. nach ihrer Inkubation keine die Calciumaktivität in der Nährlösung beeinflussende Schädigung aufweisen. Ob der danach bis zur 16 Versuchsstunde zu beobachtende geringfügige Aktivitätsanstieg darauf zurückzuführen ist, daß eine langsam zunehmende Zahl geschädigter Zellen weniger Calcium absorbiert oder selbst Calcium freisetzt, muß offen bleiben.

Für den Calciumabfall innerhalb der ersten 5 Minuten sämtlicher Versuche ist die mögliche Auswirkung von Trypsinierung und Zentrifugation zu beachten. In diesem Zusammenhang ist photographisch die beobachtete Zelle noch relativ intakt. Das könnte dadurch zu erklären sein, daß biochemische Reaktionen vor morphologisch erkennbaren Veränderungen eintreten. Sicher ist, daß die gewonnenen Befunde auf ein komplexes Zusammenspiel unterschiedlichster Faktoren beruhen (46, 40, 51, 52, 20, 37, 31, 58, 40, 24, 50, 15).

5.0.0. Zusammenfassung

Es wurde die Einsatzbereitschaft einer Ca^{++} selektiven Durchflußelektrode an Zellsuspensionen erprobt. Für die Messungen wurden Yoshida-Aszites-Tumorzellen und Amnionzellen benutzt. Bei parallel ausgeführten morphologischen Untersuchungen in einer Beobachtungskammer wurde das lichtoptisch erfaßbare Verhalten von Zellen in unterschiedlichen Nährmedien gefilmt. Die dabei registrierten Veränderungen hängen vom Calciumgehalt des Mediums ab. Beiden Zellarten gemeinsam waren das Auftreten von kleinen und größeren Vakuolen im Zellplasma, die zunehmende Verwaschenheit der Zellgrenzen, die Ausstoßung von Vesikelinhalt und Auflösung. Zusätzlich zeigten die Amnionzellen nach kurzzeitiger Inkubation in der E IV - Lösung eine Zellvergrößerung auf das zwei- bis dreifache, der später eine Schrumpfung folgte.

Bei den Messungen zeigten die AH 602 - Zellsuspensionen im Gegensatz zu den Amnionzellen sowohl steigende wie abfallende Tendenzen der Ca^{++} -Aktivität. Bei den Amnionzellen ließ sich außerdem eine rapide Aktivitätsminderung in den ersten 5 Minuten nachweisen. Diese Unterschiede können sowohl durch den Zellzyklus als auch das unterschiedliche Ausgangsmaterial, im Falle der Amnionzellen die Trypsinierung bedingt sein.

Weiterhin wurden die Durchströmungsverhältnisse für wässrige und serumartige Medien in einer Kammer mit 4 Bohrungen als Zu- und Abflüsse untersucht. Die durchgeführten Messungen im Anreicherungs- und Verdünnungsverfahren bei unterschiedlichen Ein- und Ausgangskombinationen zeigten photometrisch und photographisch recht komplexe Zusammenhänge in Abhängigkeit vom Druck der Flüssigkeitssäule, der Lage der Zu- und Abflüsse und der Durchflußgeschwindigkeiten. Insgesamt konnte bei dem serumartigen Nährmedium eine gleichmäßigere Verteilung in der Durchströmungskammer beobachtet werden.

6.0.0. Literaturverzeichnis

1. BENISCH, H.: Über das Vorkommen von Hydroxyprolin in Ehrlich-Ascites Tumorzellen. (kultiviert in vivo und vitro)
Inaug. Diss. Medizin, Marburg 1976
2. FEO, F., BONELLI, G. et al.: Further Observations on the Effects of Trypsin on the Volume and Functions of Mitochondria Isolated from Normal Liver and AH-130 Yoshida Ascites Hepatoma. Cancer. Research. 33, 1804-1812, (1973)
3. BOURNE, G.: The Human Amnion and Chorion
Lloyd-Luk. LTD., London, 1962
4. CAMMAN, K.: Das Arbeiten mit ionenselektiven Elektroden.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1973
5. CURTIS, D.R., and Mc INTYRE, H.K.: Studies in Physiologie.
Springer Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, 1965
6. DAVID.:
 8. Zellveränderungen bei Störung des Kalziumstoffwechsels.
 - a) Allgemeine Probleme der Kalziumstoffwechselstörungen.
 - b) Intracelluläre Mineralisation und Verkalkung.Verlag nicht bekannt, 1975

7. DAVIES, M.: Funktion biologischer Membranen.
Gustav-Fischer Verlag, Stuttgart,
1974
8. DETERMANN, H. und LEPUSCH, FR.:
Das Mikroskop und seine Anwendung.
Leitz, 512-69 b Firmenschrift
9. DIETLE, H.: Interferenzkontrast: ein neues
Mikroverfahren.
Kosmos, 71, 389-391, Sept. 1975
10. FERRENDELLI, J.A., RUBIN, E.H. et al.:
Influence of Diavalent Cations on
Regulation of cyclic GMP and
cyclic AMP Levels in Brain Tissue.
J. Neurochemistry. 26, 741-748,
1976
11. FRANKE, H.: Phasenkontrast Hämatologie.
Georg Thieme Verlag, Stuttgart,
1954
12. FUCHS, C.: Ionenselektive Elektroden in der
Medizin.
Thieme, 1976
13. FUCHS, G., PASCHEN, K., SPIECKERMANN und v. WESTBERG,
C.: Bestimmung des ionisierten Cal-
ciums im Serum mit einer ionen-
selektiven Durchflußelektrode:
Methodik und Normalwerte.
Klin. Wochenschrift 50, 824-832,
1972

14. GALLI, P., BRENNA, A., De CAMILLI, and MELDOLESI, J.:
Extracellular calcium and the
organisation of tight junctions
in pancreatic acinar Cells.
Exptl. Cell Res. 99, 179-183,
1976
15. GAETANI, M., SILVESTRINI, R., BELLINI, O.:
La proliferazione cellulare dell'
epatoma ascites AH 130 di Yoshida.
Sperimentale 114, 293, 1964
16. GATI, E.:
Examens morphologique et enzymo-
chimiques avec Vinca-Leucoblastine
sur lymphomes ascitique.
Bulletin du Cancer t. 50, 455-
462, 1963
17. GERICKE, D.:
Tumor-Chemotherapie und Zellzyklus.
Deutsches Ärzteblatt 17, 1197-
1202, 1975
18. GERICKE, D.:
Therapeutische und experimentelle
Fibrinolyse.
Int. Symp. vom 29. Sept. - 1. Okt.
1967 in Ulm / Donau
Sonderdruck: F.K. Schattauerverlag,
Stuttgart-New York, 1969
19. GERICKE, D.:
Methoden zur Testung von Sub-
stanzen auf Zytostatische Wirk-
samkeit.
München, Med. Wochenschrift 18,
833-838, 1973

20. GOLDBERG, D.M., HANDYSIDE, A.J., WINFIELD, D.A.:
Influence of Demographic Factors
on Serum Concentrations of Seven
Chemical Constituents in Healthy
Human Subjects.
Clinical Chemistry Vol. 19, No. 4,
395-402, 1973
21. GRAY, C. and DAVIDSON, R.G.:
A simplified technique for the
culture of amniotic fluid cells.
J. of Pediatrics 79, 119-121, 1971
22. GUNDLACH, H. und HEUNERT, H.H.:
Zur Anwendung der Interferenzkontrast-
Mikroskopie in der Biologie.
Microscopia Acta. 76, 305-315,
1975
23. HILWIG, INGEBORG:
Prüfung chemotherapeutischer Sub-
stanzen auf Verursachung reversib-
ler und irreversibler Zellschäden
am Modell der Gewebekultur.
Zeitschr. für Krebsforsch. 65,
513-523, 1963
24. HOLLINGER, T.G. and SCHUETZ, A.W.:
"Cleavage" and Cortical Granule
Breakdown in Rana Pipiens Oocytes
induced by Direkt Microinjection
of Calcium.
Journ. Cell. Biol. 71, 395-401,
1976

25. KELLNER, L., NEMETH, L., SUGAR, J. et al.:
Pharmacology of 1,6-dideoxy-
dulcitol and its Cytostatic Effect
on Transplantable Tumors.
Zeitschrift unbekannt: 17. Jg.
1037-1043, überreicht von Prof.
Nemeth, Onkopathologie Budapest/
Ungarn.
26. LATTA, Dr. Doz. Univ.-Kinderklinik Marburg/Lahn:
Persönliche Mitteilungen
27. LEITZ: Interferenz-Kontrast-Einrichtung T.
Druckschrift 550-37aR
28. LEITZ: Durchlicht-Interferenzeinrichtungen.
Druckschrift 521-23a
29. LEITZ: Phasenkontrasteinrichtung nach
Zernike
Druckschrift Nr. 513-84a
30. LETTRÉ, H., ALBRECHT, M. und LETTRÉ, R.:
1) Verhalten von Fibroblasten unter
anaeroben Bedingungen.
2) Auflösung von Plasmabewegung in
Ruhezellen.
Naturwiss. 38, 504-505, 1951
31. LETTRÉ, H.: Zur Rolle der Mitochondrien in
Tumorzellen.
Naturwiss. 39, 267, 1952

32. LETTRÉ, H. u. SCHLEICH, A.:

Zur Bedeutung der Adenosin-
triphosphsäure für Formkonstanz
und Formänderungen von Zellen.
Protoplasma Bd. XLIV/3, 44, 314,
1955

33. LETTRÉ, HANS:

L'application de la microcine-
matographie a l'etude de la cel-
lule.
Behavior of cells "in vitro".
Studies with the normal phase-
contrast-microscope in comparison
to the Nomarski microscope.
Pathologie u. Biologie, 9, 817-
818 (1961)

34. LETTRÉ, R., PAWELETZ, N., D. WERNER u. C. GRANZOW:

Sublines of the Ehrlich-Lettré
Mouse Ascites Tumour. A new tool
for experimental Cell Research.
Naturwiss. 59, 59-63, 1972

35. MÖLLRING, F.K.:

Gewebekulturkammer mit Präzisions-
Wärme-Inkubator nach Dvorak-Stot-
ler.
Zeiss: Informationsblatt Mikro
Nr. 2, 1975

36. MOORE, E.W.:

Ionized Calcium in Normal Serum,
Ultrafiltrates, and Whole Blood
Determined by Ion-Exchange
Electrodes.
The J. of Clin. Investigation 49,
318-334, 1970

37. MORRIS, G.E., PIPER, M. and COLE, R.:

Differential Effects of Calcium
Ion Concentration on Cell Fusion,
Cell Division and Creatine Kinase
Activity in Muscle Cell Cultures.
Exptl. Cell Res. 99, 106-114, 1976

38. NEMETH, L. and KELLNER, B.:

A New Mouse Ascites Tumour to
be Used as a Screening Tool.
Neoplasma 8, 337-342, 1961

39. NICHOLSON PREC. INSTR.:

Operating Manual Air Stream
Incubator ASI-400

40. NICOLSON, G.L. and POSTE, G.:

The Cancer Cell: Dynamic Aspects
and Modifications in Cell-Sur-
face Organization.

First of two Parts: The New Eng-
land Journal of Medicine, 295,
198-203

Second of two Parts: The New Eng-
land Journal of Medicine, 295,
253-258, 1976

41. OMANG, S.H. and VELLAR, O.D.:

Analytical error due to concen-
tration gradients in frozen and
thawed samples.

Clinical Chimica Acta 49, 125-
126, 1973

42. ORION RESEARCH INC.: Orion Ionalyzer, Instruction
Manual calcium ion electrode
model 92-20
Bedienungsanleitung zu obigem
Modell
43. PASCHEN, K.: Die Bestimmung des Calciums und
seiner Fraktionen im Serum.
Methoden, Normalwerte und klinische
Bedeutung.
Thieme, 1975
44. PAUL, J.: Cell and tissue culture.
Churchill Livingstone Edinburgh
and London fourth Edition 1973
45. PEDERSEN, K.O.: Determination of Calcium Fractions
of Serum. III Ionized Calcium in
Ultrafiltrates of Normal Serum
and Examination of Pertinent
Variables.
Scand. J. Clin. Laboratory,
Invest. LVND. 25, 223-230, 1970
46. PERRIS, A.D. and WHITFIELD, J.F.: Calcium and the Control of
Mitosis in the Mammal.
Nature Vol. 216, 1350-1351, 1967
47. PSYREMBEL, W.: Prakt. Geburtshilfe
14. Auflage, Verlag Walter de
Gruyter Berlin, New York, 1973

48. RASMUSSEN, H.: Cell Communication, Calcium Ion,
and Cyclic Adenosine Monophosphate.
Science Vol. 170, 404-412, 1970
49. REUSS, L. and FINN, A.L.:
Electrical Properties of the Cellular
Transepithelial Pathway in
the Necturus Gallbladder.
Membrane Biology 25, 141-161, 1975
50. RIDGWAY, E.B. and GORDON, A.M.:
Muscle Activation: Effects of
small Length Changes on Calcium
Release in Single Fibers.
Science 189 881-884, 1975
51. v. ROSSUM, G.D.: Relation of Intercellular Ca^{++}
to Retention of K^{+} by Liver
Sclices.
Nature 225, 638-639, 1970
52. Aus: SANDOZ, 14849, Firmenschrift Juni 1974/HE:
Hoher täglicher Calciumbedarf
53. SCHACHTSCHABEL, D.O. and FOLEY, G.E.:
Serial Cultivation of Ehrlich
Ascites Tumor Cells in Hypertonic
Media.
Exp. Cell. Res. 70, 317-324, 1972
54. SCHINDLER, J.G. und RIEMANN, W.:
1) Scheibenelektrode
2) Calciumselektive Scheiben-Elek-
trode für Durchflußmessungen
Biomed. Technik 20, 75-77, 1975

55. SCHINDLER, J.G., RIEMANN, W., SCHÄL, W.:

Kaliumselektive Scheiben-Elektrode
mit Valinomycin für Durchflußmes-
sungen.

Biomed. Techn. 21, 135-137, 1976

56. SCHINDLER, J.G., RIEMANN, W.:

Elektrochemische Multimeßsysteme
für Physiologie und Medizin.

Koordinierte Forschung

Inst. für Angewandte Physiologie
der Philipps-Universität Marburg

Dr. E. Fresenius Chemisch-Pharma-
zeutische Industrie KG,

Apparatebau KG Bad Homburg

V.D.H. 1977

57. SEAMONDS, B., TOWFIGHI, J., ARVAN, D.A.:

Determination of Ionized Calcium
in Serum by Use of an Ion-Selec-
tive Elektrode.

I. Determination of Normal Values
under Physiologic Conditions with

Comments on the Effects of Food
Ingestion and Hyperventilation.

Clin. Chemistry Vol. 13, No. 2,
155-160, 1972

58. SIERING, HANS:

Zytomorphologische Vitalunter-
suchungen am Mäuse Ascites Car-
cinom.

Naturwiss. 39, 267-268, 1952

59. STEFFEN, CH., SCHINDLER, J.G. et al.:
(Kurzberichte)
Ionisiertes Calcium im Pankreassaft des Hundes:
Fortlaufende Registrierung mit einer Scheibenelektrode.
Biomed. Techn. Bd. 21, Heft 6, 188-189, 1976
60. STOLL, P.:
Gynäkologische Vitalcytologie in der Praxis.
Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York 6, 1969
61. TEDESCHI, H.:
Cell Physiology: Molecular Dynamics. Academic Press. New York and London, 1974
62. TRINKAUS, B.:
Persönliche Mitteilung:
Humangenetik Marburg, Chromosomenlabor
63. VAHAR-MATIAR, H.:
Korrelation zwischen Magnesium und anderen Serumelektrolyten bei neuro-psychiatrischen Erkrankungen.
Med. Welt 27, 2501-2505, 1976
64. VOLLMER, K.E.:
Mündl. Mitteilungen und Inaug. Diss. Medizin in Vorbereitung Marburg, 1977

65. WIEDEMANN, H.-R.: Pathologie der Vererbung und Konstitutionspathologie (Seite: 104-145)
In: Lehrbuch der Kinderheilkunde
Feer Joppich
23. Auflage, 1975
66. WILLMER: Cells and Tissues in Culture: Methods, Biology and Physiology, Academic Press London, New York, 1965 und ff
67. WRBA, H.: Vitalitätsbestimmung durch markierte Verbindungen.
Z. f. Zellforschung 53, 90-140, 1960
68. YOSHIDA, T.: Zelluläre Multizentrität der Krebsentstehung.
Studien mit dem Ascites-Hepatom der Ratte.
Deutsche Med. Wochenschr. 46, 2229-2238, 1963
69. ZEISS: Forschungsmikroskop Standard W L
Druckschrift G.41-130/I-d

Abschließend möchte ich Herrn Prof. Dr. Oepen für die Überlassung des Themas sowie für sein ständiges Interesse und seine Hilfe bei der Anfertigung der Arbeit danken.

Meinen besonderen Dank möchte ich Herrn Dr. Dr. Schindler (Institut f. Angewandte Physiologie der Philipps-Universität Marburg, Lahnberge) für seine unermüdliche und selbstlose Beratung und Unterstützung bei den Untersuchungen mit der calciumselektiven Elektrode aussprechen.

Gedankt sei auch den Herren Riemann und Braun (Inst. f. Angewandte Physiologie der Philipps-Universität Marburg, Lahnberge) für die Anfertigung der Elektrode und der Firma Dr. Fresenius KG (Apparatebau Bad Homburg) für die großzügige Bereitstellung der elektrochemischen Geräte.

Für die Überlassung von Zellmaterial möchte ich Herrn Doz. Dr. Gericke (Abt. f. Krebsforschung der Firma Höchst, Ffm.) und Frau Trinkaus (Chromosomenlabor im Humangenetischen Institut der Univ. Marburg), für die Beratung und Unterstützung auf dem Gebiet der Mikrokinematographie möchte ich besonders Herrn Vollmer (Humangenetisches Institut der Univ. Marburg) sowie Herrn Steinbach (Leitz-Wetzlar) danken.

Lebenslauf

Am 23.3.1951 wurde ich, Ulrike Schüte, als Tochter des Molkereileiters Willi Schüte und dessen Ehefrau Martha Schüte, geb. Bunte, in Voßheide, Kreis Lemgo geboren.

Von 1958-1962 besuchte ich in Lemgo die Grundschule und anschließend an der Marianne-Weber-Schule das Gymnasium für Frauenbildung zur Erlangung einer fachgebundenen Hochschulreife mit Abitur im Juni 1970. Nach einer Ergänzungsprüfung im Oktober 1970 in Französisch wurde mir die allgemeine Hochschulreife anerkannt.

Im Wintersemester 1970/71 konnte ich mich in der Zahnheilkunde an der Universität Marburg immatrikulieren. Nach bestandenen Vorphysikum im Sommer 1971 gelang ein Wechsel auf das Studium der Humanmedizin mit einer Ergänzungsprüfung in Botanik 1972. Nach bestandener ärztlicher Vorprüfung 1973 wechselte ich an die Universität Wien, um dort die ersten beiden klinischen Semester zu absolvieren. Anschließend führte ich das Studium an der Universität Marburg fort und legte am 14. Januar 1977 die ärztliche Prüfung ab.

Marburg, den 22. 3. 1977

Meine akademischen Lehrer waren die Damen und Herren
Professoren und Dozenten

an der Universität Marburg / Lahn:

Amon, Arndt, Aurich, Aziz, Braasch, Buchholz, Casten-
holz, Dehnicke, Dimroth, Dittrich, Dombrowski, Eißner,
Eschenbach, Friederich, Gerdes, Graul, Grundner,
Habermehl, Haberich, Hamm, Hamelmann, Hardewig, Hensel,
Heß, Heuser, Hildebrandt, Hilgermann, Hort, Huch, Ihm,
Jacob, Joseph, Kaffarnik, Karlson, Klaus, Kleinsasser,
Kern, Koecke, Koransky, Lauer, Lauth, Linneweh, Ludwig,
Lütcke, Maroske, Martini, Oepen I., Oepen H., Petry,
Pfütz, Portig, Remschmidt, Richter, Rodeck, Rohen,
Rupec, Schaumlöffel, Siegel, Siegert, Schmitz-Moor-
mann, Schneider, Sodomann, Golenhofen, Straub, Thoenes,
Troidl, Walcher, Wehrmeyer, Welge-Lüßen, Wendt, Willen-
bockel.

an der Universität Wien:

Asperger, Berner, Chiari, Deutsch, Fellingner, Flamm,
Gitsch, Holzner, Husslein, Janisch, Kaiser, Kucsco,
Langer, Lindner, Navratil, Novotny, Obiditsch-Mayer,
Palmerich, Reisner, Rockenschaub, Slezak, Speiser,
Tappeiner, Thalhammer.

